

اثر ضد آپوپتوز دپرنیل در نورونهای حسی گانگلیون ریشه پشتی نخاع رت بعد از قطع عصب سیاتیک

دکتر رحیم حب نقی^{۱*} دکتر تقی طریحی^۲

دریافت مقاله: ۲۷ بهمن ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۱۵ تیرماه ۱۳۸۲

Antiapoptotic effect of deprenyl in sensory neurons of rat dorsal root ganglion after sciatic nerve transection

Hobbenaghi, R.,¹ Tiraihi, T.²

¹Department of pathobiology, Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia- Iran. ²Department of Anatomical Tarbiat Modarres University of Medical, Tehran-Iran.

Objective: Study on antiapoptotic effect of Deprenyl in sensory neurons of dorsal root ganglion of rat.

Animals: White Sprague-Dawley rats. The regions of operation were sciatic nerve in midthigh and L₅ dorsal root ganglion.

Procedure: New born rats (3rd days) were divided into five groups and their left side sciatic nerves were transected at midthigh region. Five test groups were administered by deprenyl in different doses of: 0.1, 1, 10, 25 and 50 mg/Kg and the antiapoptotic effect of drug were compared with control group.

Statistical analysis: The values obtained from each test groups were compared with control group by t-test and oneway ANOVA.

Results: The results showed that treatment of animal with deprenyl prevented reduction in neurons number, in dose dependent manner. The group treated with dose 25mg/Kg showed the better results.

Conclusion: Deprenyl is able to prevent the induction of apoptosis in axotomized and nonaxotomized neurons. *J.Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 60,1:65-69,2005.*

Key words: Apoptosis, Axotomy, Dorsal Root Ganglion, Deprenyl.

Corresponding author's email: hobbenaghi@yahoo.com

هدف: بررسی اثرات ضد آپوپتوز دپرنیل در اعصاب حسی ریشه‌های پشتی نخاع.

حیوانات: موش رت سفید نژاد Sprague-Dawley، محل عمل: عصب سیاتیک و گانگلیون‌های ریشه‌های پنجم پشتی نخاع.

روش: عصب سیاتیک موشهای صحرایی نوزاد (سه روزه) در ناحیه پشتی ران قطع گردیده و اثرات ضد آپوپتوز دپرنیل در مقادیر ۰/۱، ۱، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در ۵ گروه شش تایی از موشهای عمل شده با حیوانات گروه کنترل مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: دپرنیل باعث جلوگیری از کاهش آپوپتوتیک نورونها به صورت معنی داری ($P < 0/05$) گردیده و در بین گروههای آزمایشی، در گروه ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم بیشترین اثر را داشته‌است.

تجزیه و تحلیل آماری: مقایسه نتایج حاصل از گروههای آزمایشی با نتایج گروه کنترل و آنالیز آنها با استفاده از آزمون تی و آزمون آنالیز واریانس یکطرفه.

نتیجه‌گیری: دپرنیل، اثرات ضد آپوپتوتیک خود را با جلوگیری از آپوپتوز حاصل از آکسوتومی و آپوپتوز خود به خودی بعد از تولد در نورونهای حسی ریشه‌های پشتی نخاع اعمال نموده است. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۱، ۶۹-۶۵.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، آکسوتومی، ریشه‌های پشتی نخاع، دپرنیل.

بر اساس مطالعات انجام گرفته، قطع عصب سیاتیک موجب کاهش تعداد نورونهای موجود در گانگلیون‌ها (عقد‌های) ریشه‌های پشتی یا Root Ganglion Dorsal (DRG)، نخاع از طریق مرگ آپوپتوتیک می‌شود (۹،۱۱).

مرگ آپوپتوتیک یا برنامه ریزی شده سلولهای عصبی در روندهای فیزیولوژیک نیز وجود داشته و تقریباً نیمی از سلولهای تولید شده زمان جنینی دستگاه عصبی قبل از تکامل نهایی، با این روش از بین می‌روند (۵،۷). روند آپوپتوز در نورونهای DRG رت تا یک هفته بعد از تولد نیز ادامه دارد (۱۷).

سلولهای عصبی، بعضی از عوامل رشد و بقای خود را از بافت هدف و به صورت انتقال معکوس دریافت می‌کنند. لذا در صورت قطع ارتباط آکسونی و عدم دریافت فاکتورهای تروفیک محیطی، جسم نوروئی دچار آپوپتوز می‌شود (۱۴،۱۶).

اثر آپوپتوتیک حاصل از قطع آکسون در نورونهای نوزادان شدیدتر از

بالغین می‌باشد (۶). به طوری که مطابق یک گزارش، ۷۰ درصد نورونهای ریشه‌های پشتی نخاع موش رت نوزاد بعد از عمل آکسوتومی مردند (۴).

دپرنیل [(-)-Deprenyl]، به عنوان یک مهارکننده منوآمین اکسیداز -

B باعث کاهش مرگ نورونها، حتی بعد از قرار گرفتن آنها در معرض آسیب مرگبار می‌شود (۱۸). مطابق گزارش Unal و همکاران در سال ۲۰۰۱ دپرنیل در سلولهای آسیب دیده ناشی از انفارکسیون مغز توانست ۵۱ درصد سلولهای آسیب دیده را از مرگ نجات دهد (۱۹). این دارو سلولهای عصبی را از طریق اثر مستقیم بر انتقال الکترون و ممانعت از تأثیر سموم بر میتوکندری‌ها محافظت می‌نماید (۸). دپرنیل با عمل بر روی بیان ژن‌های مربوط به نگهداری فونکسیون میتوکندری‌ها و پایدار نمودن پتانسیل دیواره میتوکندری و تولید سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز زیاد، رادیکالهای آزاد

۱) گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.

۲) گروه آموزشی علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران.

* نویسنده مسئول: hobbenaghi@yahoo.com



جدول ۲- نمایش میانگین (درصد) افزایش نورونهای سمت چپ آکسوتومی شده گروههای آزمایشی (AxL) نسبت به نورونهای آکسوتومی شده همان سمت گروه کنترل (AxLc). میانگین تعداد نورونهای سمت چپ گروه کنترل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده است.

Mean±SEM درصد افزایش نورونهای AxL نسبت به AxLc	گروهها (میلیگرم در کیلوگرم)
۶۹*±۱۲	۰/۱
۷۵*±۳/۹	۱
۸۰*±۸/۲	۱۰
۱۴۸*±۱۲	۲۵
۵۹*±۱۶	۵۰

* = $P < 0.05$

کنار مادرانشان منتقل گردیدند. دارو ساخت شرکت CITLA و به صورت پودر بوده، مطابق دستور از سرم نمکی (فیزیولوژیک) به عنوان حلال استفاده شد. اولین تزریق بلافاصله بعد از قطع عصب انجام شده، تزریقات بعدی در فواصل ۲۴ ساعت تا ۲۱ روز بعد از عمل انجام گردید.

ج) گروههای آزمایشی: حیوانات مورد آزمایش در ۶ گروه ۶ تایی تقسیم گردیدند. ۵ گروه از این موشها مقادیر مختلفی از شکل تزریقی دپرنیل را به صورت داخل صفاقی (ip) دریافت نمودند. حیوانات گروه ششم به عنوان گروه کنترل بعد از انجام آکسوتومی، بجای دارو، سرم فیزیولوژی را از همان مسیر و همان مقدار دریافت نمودند. گروه بندی حیوانات که براساس مقدار داروی دریافتی انجام گردید بشرح زیر بود: گروههای ۰/۱، ۱، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلیگرم در کیلوگرم؛ حیوانات مقادیر مذکور دارو را در حجم های ۰/۱ - ۰/۲ سانتیمتر مکعب از روز عمل تا روز ۲۱ دریافت نموده، در روز ۲۲، بعد از انجام بیهوشی کامل کشته شدند. مطابق نظر Gelderd و chopin در سال ۱۹۷۷، گانگلیون ریشه پشتی L_۵ نخاع که عصب سیاتیک عمدتاً از آن ریشه منشاء میگیرد در موش رت در محل L_۵ استون فقرات واقع شده است. لذا جهت برداشت آن مطابق روش عمل مقاله مذکور سگمان نخاعی به همراه ریشه پشتی و گانگلیون مربوطه واقع در ناحیه L_۵ استون فقرات برداشت گردید. نمونهها در فرمالین ۱۰ درصد بافر فیکس شده، مطابق روشهای روتین آزمایشگاهی، بلوکهای پارافینه تهیه و سپس مقاطع ۵ میکرونی به صورت پی در پی (سریال) تهیه گردیده و با تکنیک همتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی شدند. مقاطع مورد نظر با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۲۰۰ مورد مطالعه قرار گرفتند.

روش آماری

برای تعیین تعداد نورونهای DRG از روش شمارش سریال استفاده گردید. در این روش از هر ۵ مقطع یک برش (برش اول) انتخاب شده و نورونهای حاوی هسته و هستک هر برش با استفاده از دستگاه Drawing tube شمارش شده و مجموع نورونهای مورد شمارش در عدد ۵ ضرب گردید.

جدول ۱- نمایش میانگین (درصد) کاهش نورونهای سمت چپ آکسوتومی شده همه گروهها (AxL) نسبت به نورونهای سمت راست آکسوتومی نشده همان گروهها (NaxR). میانگین تعداد نورونهای سمت راست ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده است.

Mean±SEM درصد کاهش نورونهای AxL نسبت به NaxR	گروهها (میلیگرم در کیلوگرم)
۳۲*±۴/۵	۰/۱
۳۱*±۵/۱	۱
۳۳*±۸/۶	۱۰
۱۹*±۱/۲	۲۵
۴۳*±۱۰/۱	۵۰
۴۸*±۷/۵	کنترل

* = $P < 0.05$ ، SEM = Standard Error Mean

سیتوپلاسمی را کاهش داده، اثرات حاصله از قطع فاکتورهای رشد و بقای عصب را از بافت هدف جبران نموده و در نتیجه آپوپتوز را مهار می نماید (۱۰، ۱۳، ۱۸، ۲۰). دپرنیل علاوه بر اثرات فوق الذکر باعث رشد جمعیت سلولهای عصبی و نوروگلیال نیز می شود (۱۸).

آثار آپوپتوز در سطح میکروسکوپ نوری به صورت چروکیدگی سلول، تراکم کروماتین در محیط هسته و تشکیل هلال کروماتینی و تشکیل اجسام آپوپتوتیک قابل مشاهده می باشد (۲، ۱۵). از آنجائی که DRG بخشی از دستگاه اعصاب محیطی و حاوی اجسام نورونهای حسی بوده، در تحقیقات انجام گرفته قبلی اثرات محافظتی دپرنیل بر نورونهای موجود در بافت مغز و نیز نورونهای شاخ حرکتی نخاع اثبات گردیده است (۱۲)، این تحقیق با هدف بررسی اثرات ضد آپوپتوز دپرنیل در نورونهای حسی DRG بعد از عمل آکسوتومی انجام گرفته است.

مواد و روش کار

الف) حیوانات مورد استفاده و روش نگهداری آنها: در این تحقیق موشهای صحرایی نوزاد نژاد سفید Sprague - Dawley مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات مورد آزمایش در قفسهای مخصوص بهمراه مادران خود نگهداری شده و به صورت آزاد از شیر مادر و بعداً از آب و مواد غذایی استفاده می کردند. چرخه روشنایی - تاریکی آنها ۱۲/۱۲ ساعت بود.

ب) نحوه جراحی: نوزادان مورد نظر در روز سوم بعد از تولد بمدت ۱۰-۵ دقیقه بر روی بالشتک یخ قرار گرفته و بیهوش شدند. سپس عصب سیاتیک پای چپ آنها پس از برش پوست و عضلات ناحیه میانی - پشتی ران قطع گردید. به منظور جلوگیری از ترمیم مجدد عصب، در محل برش، قطعه کوچکی از عصب جدا گردید. بعد از قطع عصب، عضلات و پوست ناحیه مورد عمل با نخ شماره ۶ بخیه زده شده و بعد از گرم شدن بدن حیوان به



حضور اجسام آپوپتوتیک (Apoptotic body) که نشان دهنده بقایای سلولهای یاد شده است، بوضوح دیده می‌شد (تصویر ۲).

بحث

بررسی نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از این می‌باشد که عمل آکسوتومی باعث کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) در تعداد نورونهای گانگلیون‌های ریشه پشتی مربوطه شده و این کاهش بر اثر آپوپتوز به وقوع پیوسته است. در گروههای آزمایشی، تیمار با دپرنیل موجب جلوگیری از آپوپتوز و کاهش نورونها را فراهم نموده، در مجموع باعث افزایش آنها شده است. به طوری که از نتایج جدول ۱ مشخص می‌گردد در عقده‌های سمت آکسوتومی شده گروه کنترل، ۴۸ درصد نورونها نسبت به نورونهای سمت راست خود کاهش نشان می‌دهند. به عبارت دیگر ۴۸ درصد نورون‌ها در اثر آکسوتومی از بین رفته‌اند. این در حالی است که در عقده‌های گروههای آزمایشی این کاهش بالنسبه کمتر بوده و مخصوصاً در گروه ۲۵ میلیگرم در کیلوگرم به کمترین میزان یعنی به ۱۹ درصد رسیده و این نتیجه، در مقایسه سایر گروهها معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در ضمن در گروه ۵۰ میلیگرم در کیلوگرم بر خلاف روند مورد انتظار، یک آشفستگی در نتایج دیده می‌شود که در نتایج هر سه جدول مشهود بوده و با توجه به اینکه Panahi و Taki در سال ۲۰۰۲ همین آشفستگی را در دوز ۶۰ میلیگرم در کیلوگرم به بالای دپرنیل مشاهده نموده و آنرا به دوز سمیت دارو نسبت داده‌اند (۱۲)، احتمالاً این آشفستگی نیز به همان دلیل می‌باشد.

نتایج جدول ۲ تاثیر دپرنیل را در جلوگیری از آپوپتوز به صورتی دیگر توضیح می‌دهد؛ چنانچه مشاهده می‌گردد مقایسه میانگین درصد نورونهای ریشه پشتی نخاع سمت چپ گروههای مورد آزمایش (AxL) با میزان نورونهای همان سمت در گروه کنترل (AxLc) نشان می‌دهد که با افزایش دوز دارو در صد نورونهای گروههای آزمایشی نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرده است؛ به طوری که نورونهای سمت چپ گروه ۰.۱ میلیگرم در کیلوگرم، به میزان ۶۹ درصد نسبت به عقده مشابه گروه کنترل افزایش را نشان می‌دهد. رقم مذکور برای گروههای بعدی بترتیب افزایش مقدار داروی تجویز شده، ۷۵ درصد، ۸۰ درصد، ۱۴۸ درصد و ۵۹ درصد می‌باشد. چنانچه مشخص است بیشترین افزایش (۱۴۸ درصد) متعلق به گروه ۲۵ میلیگرم در کیلوگرم بوده است و این نتیجه با گزارش Paterson و همکاران در سال ۱۹۹۸ که با مقدار ۲۵ میلیگرم در کیلوگرم دپرنیل بهترین نتایج حفاظتی نورونها را گزارش کرده است (۱۳) مطابقت دارد.

مقایسه میانگین درصد نورونهای سمت آکسوتومی نشده (راست) گروههای مورد آزمایش (NaxR) که صرفاً از دارو تاثیر پذیرفته‌اند با نورونهای گانگلیون سمت راست گروه کنترل (NaxRc) که از هیچ‌گونه تاثیر دارویی و جراحی متأثر نبوده‌اند (جدول ۳)، نشان می‌دهد که متناسب با افزایش دوز دپرنیل، نسبت مذکور افزایش پیدا کرده است. این نسبت در گروه ۰.۱ میلیگرم در کیلوگرم به ۳۰ درصد و در گروههای بعدی به ترتیب به

۳۰ درصد (درصد افزایش نورون‌های سمت راست آکسوتومی نشده) می‌باشد. این افزایش (NaxR) نسبت به نورونهای آکسوتومی نشده همان سمت گروه کنترل (NaxRc). میانگین تعداد نورونهای سمت راست گروه کنترل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده است.

گروهها (میلیگرم در کیلوگرم)	Mean ± SEM
۰/۱	۳۰ ± ۳/۸
۱	۳۷ ± ۴/۹
۱۰	۴۰ ± ۲/۱
۲۵	۶۰ ± ۹/۶
۵۰	۴۳ ± ۸/۸

* = $P < 0.05$

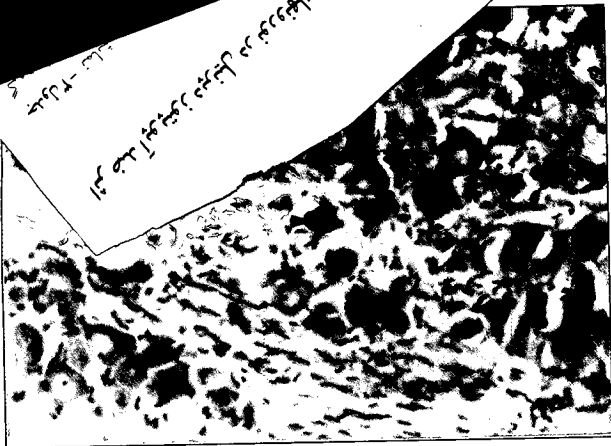
میانگین تعداد نورونهای شمارش شده در گانگلیون‌های (سمت راست و چپ) گروه شاهد و نیز میانگین تعداد نورونهای شمارش شده در عقده‌های سمت آکسوتومی نشده (راست) گروههای آزمایشی به عنوان مبنا و ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شدند. آنگاه میانگین تعداد نورونهای شمارش شده عقده‌های آکسوتومی شده (سمت چپ) هر یک از گروههای آزمایشی به عنوان در صدی از نورون‌های مبنا، محاسبه گردیدند. برای مقایسه میانگین درصد نورونهای سمت راست و چپ در هر گروه و آنالیز آماری آنها از آزمون تی و برای مقایسه نورونهای گروههای آزمایشی با گروه کنترل از آنالیز یکطرفه واریانس و در ادامه آن از آزمون Dunnet استفاده گردید.

نتایج

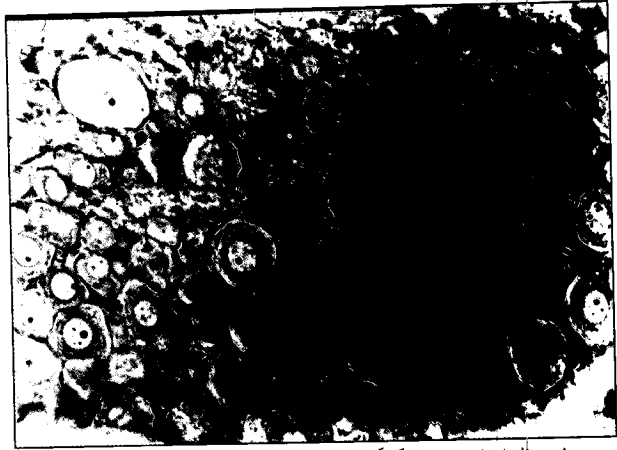
مقایسه تعداد نورونهای گانگلیون سمت چپ آکسوتومی شده (AxL) با نورونهای سمت راست آکسوتومی نشده (NaxR) در هر یک از گروههای مورد آزمایش (از ۰/۱ الی ۵۰ میلیگرم در کیلوگرم) نشان داد که عمل آکسوتومی باعث کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) در تعداد نورونها و به عبارت دیگر کاهش در صد آنها در گروههای آزمایشی شده است. این کاهش بترتیب ۳۲ درصد، ۳۱ درصد، ۳۳ درصد، ۱۹ درصد و ۴۸ درصد بود (جدول ۱). همچنین مشخص گردید که نورونهای عقده سمت چپ هر یک از گروههای آزمایشی نسبت به نورونهای همان سمت گروه کنترل (AxL/AxL) بترتیب به میزان ۶۹ درصد، ۷۵ درصد، ۸۰ درصد، ۱۴۸ درصد و ۵۹ درصد افزایش پیدا کرده است ($P < 0.05$) (جدول ۲). مقایسه تعداد نورونهای سمت (راست) گروههای مورد آزمایش با تعداد نورونهای همان سمت گروه کنترل (NaxR/NaxRc) نشان داد که میانگین نورونهای سمت راست گروههای پنجگانه مورد آزمایش بترتیب ۳۰ درصد، ۳۷ درصد، ۴۰ درصد، ۶۰ درصد و ۴۳ درصد افزایش پیدا کرده است ($P < 0.05$) (جدول ۳).

مشاهدات ریزبینی مقاطع نورون‌های آکسوتومی شده وقوع آپوپتوز را تایید می‌نمود. در نورونهای مذکور، علایم میکروسکوپی آپوپتوز شامل چروکیده شدن نورونها، تجمع کروماتین در زیر غشا هسته و یا فشرده شدن آن در یک سمت هسته و تشکیل هلال کروماتینی (Nuclear Cap) و نیز





تصویر ۲ - تصویر از نورونهای آپوتوتیک گانگلیون سمت چپ (آکسوتومی شده) در گروه کنترل. به نورونهای چروک خورده و فشرده شدن کروماتین در یکطرف هسته (پیکان ضخیم) و اجسام آپوتوتیک (پیکان نازک) و نیز ابعاد نورونها، توجه شود. H&E و بزرگمایی: ۲۰۰.



تصویر ۱ - منظره‌ای از نورونهای گانگلیون سمت راست (آکسوتومی نشده) در گروهی که با ۲۵ میلیگرم دپرنیل تحت درمان قرار گرفته است. (به هسته‌های روشن حاوی هستک و ابعاد نورونها توجه شود. H&E و بزرگمایی: ۲۰۰).

بافت شناسی دانشگاه‌های ارومیه و تربیت مدرس که در انجام این پژوهش نقش سازنده‌ای را ایفاء نموده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Ebadi, M., Sharma, S., Shavali, S., ElRefaey, H.(2002): Neuroprotective actions of selegiline. J, Neurosci Res; 67(3):285-9.
2. Gaffney, EP., Oneill, AS., Staunton, MJ. (1995): Insitu end-labelling, light microscopic assessment and ultrastructure of apoptosis in lung. J, Clin Pathol; 48(11): 1017-21.
3. Gelderd, JB., Chopin, SF.(1977): The Vertebral Level of origin of Spinal Nerves in the Rat. Anat Rec; 188:45-48.
4. Himes, BT., Tessler, A.(1989): Death of some dorsal root ganglion neurons and Plasticity of others following sciatic nerve section in adult and neonatal rats. J Comp Neurol; 284(2):215-30.
5. Lee, L., Rubin.(1973): Neuronal cell death: when, why and how. British Medical Bulletin; 53(3):617-631.
6. Li, L., Oppenheim, RW., Lei M., Houenou, LJ(1994): Neurotrophic agents prevent Motoneuron Death following sciatic nerve section in the neonatal mouse. Journal of Neurobiology; 25(7):759-766.
7. Liu, DX., Greene. LA'(2001): Neuronal apoptosis at the G1/s cell cycle check point. Cell Tissue Res; 305(2):217-28.

۳۷ درصد، ۴۰ درصد، ۶۰ درصد و ۴۳ درصد رسیده است. مطابق نظر Sugimoto و همکاران در سال ۱۹۹۸ نورونهای موجود در DRG و ریشه حسی عصب سه قلو (Trigeminal) رت بترتیب ۱۶ درصد و ۲۴-۱۲ درصد در هفته اول بعد از تولد از بین می‌روند و این از بین رفتن نورونها به صورت آپوتوز و ناشی از رقابت آنها جهت دریافت فاکتورهای رشد و بقا نظیر فاکتور رشد عصبی nerve growth factor از بافت هدف می‌باشد (۱۷). لذا این افزایش درصد نورونهای سمت راست را می‌توان چنین توجیه نمود که داروی دپرنیل از انجام آپوتوز خودبه‌خودی بعد از تولد در آنها جلوگیری نموده است. بنابراین نورونهایی که قرار بود بمیرند زنده باقی مانده و جمعیت نورونی در گانگلیون ریشه نخاعی در مجموع افزایش پیدا کرده است. این نتیجه‌گیری با نتایج کار Tatton و همکاران در سال ۱۹۹۶ که یک نقش افزایش دهنده را در جمعیت نورونی برای دپرنیل شرح داده‌اند مطابقت دارد (۹).

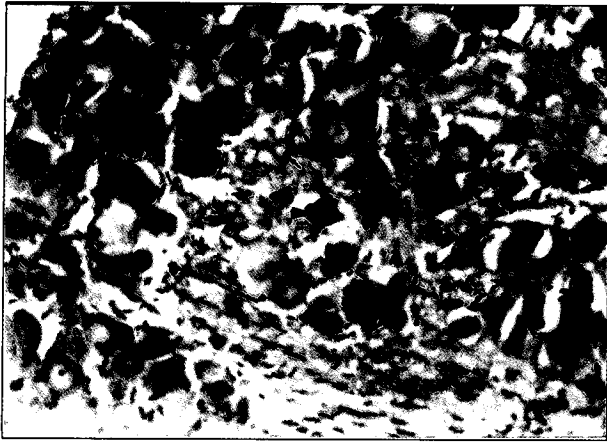
چنانچه مشاهده می‌شود دپرنیل، هم در ریشه‌هایی که دچار آکسوتومی شده‌اند توانسته است از آپوتوز ناشی از قطع ارتباط آکسونی جلوگیری نماید و هم در ریشه‌های سمت سالم از آپوتوز خودبه‌خودی بعد از تولد جلوگیری نماید.

نقش حفاظتی دپرنیل در سیستم اعصاب مرکزی (CNS) و اعصاب حرکتی توسط محققین زیادی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۸). پژوهش‌های حاضر اثرات ضد آپوتوز دپرنیل را بر روی نورونهای حسی ریشه‌های پشتی نخاع که بخشی از دستگاه اعصاب محیطی (Peripheral Nervous System) می‌باشد به نمایش گذاشته، در مجموع نشان می‌دهد که دپرنیل با مکانیسم‌های مشترکی هم در CNS و هم در PNS از ورود نورونها به فاز مرگ سلولی و آپوتوز جلوگیری می‌کند.

تشکر و قدردانی

از همکاران محترم، آقای دکتر دلشاد عضو هیئت علمی دانشگاه شاهد، آقای کهربا و آقای بیرانوند کارشناسان آزمایشگاههای پاتولوژی و





تصویر ۲- تصویری از نورونهای آپوپتوتیک گانگلیون سمت چپ (آکسوتومی شده) در گروه کنترل. به نورونهای چروک خورده و فشرده شدن کروماتین در یکطرف هسته (پیکان ضخیم) و اجسام آپوپتوتیک (پیکان نازک) و نیز ابعاد نورونها، توجه شود. H&E و بزرگنمایی: ۲۰۰.



تصویر ۱- منظره‌ای از نورونهای گانگلیون سمت راست (آکسوتومی نشده) در گروهی که با ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم دپرنیل تحت درمان قرار گرفته است. (به هسته‌های روشن حاوی هستک و ابعاد نورونها توجه شود. H&E و بزرگنمایی: ۲۰۰).

بافت شناسی دانشگاههای ارومیه و تربیت مدرس که در انجام این پژوهش نقش سازنده‌ای را ایفاء نموده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Ebadi, M., Sharma, S., Shavali, S., ElRefaey, H. (2002): Neuroprotective actions of selegiline. *J. Neurosci Res*; 67(3):285-9.
2. Gaffney, EP., Oneill, AS., Staunton, MJ. (1995): Insitu end-labelling, light microscopic assessment and ultrastructure of apoptosis in lung. *J. Clin Pathol*; 48(11): 1017-21.
3. Gelderd, JB., Chopin, SF. (1977): The Vertebral Level of origin of Spinal Nerves in the Rat. *Anat Rec*; 188:45-48.
4. Himes, BT., Tessler, A. (1989): Death of some dorsal root ganglion neurons and Plasticity of others following sciatic nerve section in adult and neonatal rats. *J Comp Neurol*; 284(2):215-30.
5. Lee, L., Rubin. (1973): Neuronal cell death: when, why and how. *British Medical Bulletin*; 53(3):617-631.
6. Li, L., Oppenheim, RW., Lei M., Houenou, LJ (1994): Neurotrophic agents prevent Motoneuron Death following sciatic nerve section in the neonatal mouse. *Journal of Neurobiology*; 25(7):759-766.
7. Liu, DX., Greene. LA' (2001): Neuronal apoptosis at the G1/s cell cycle check point. *Cell Tissue Res*; 305(2):217-28.

۳۷ درصد، ۴۰ درصد، ۶۰ درصد و ۴۳ درصد رسیده است. مطابق نظر Sugimoto و همکاران در سال ۱۹۹۸ نورونهای موجود در DRG و ریشه حسی عصب سه قلو (Trigeminal) رت بترتیب ۱۶ درصد و ۲۴-۱۲ درصد در هفته اول بعد از تولد از بین می‌روند و این از بین رفتن نورونها به صورت آپوپتوز و ناشی از رقابت آنها جهت دریافت فاکتورهای رشد و بقا نظیر فاکتور رشد عصبی (nerve) growth factor از بافت هدف می‌باشد (۱۷). لذا این افزایش درصد نورونهای سمت راست را می‌توان چنین توجیه نمود که داروی دپرنیل از انجام آپوپتوز خودبه‌خودی بعد از تولد در آنها جلوگیری نموده است. بنابراین نورونهایی که قرار بود بمیرند زنده باقی مانده و جمعیت نورونی در گانگلیون ریشه نخاعی در مجموع افزایش پیدا کرده است. این نتیجه‌گیری با نتایج کار Tatton و همکاران در سال ۱۹۹۶ که یک نقش افزایش دهنده را در جمعیت نورونی برای دپرنیل شرح داده‌اند مطابقت دارد (۹).

چنانچه مشاهده می‌شود دپرنیل، هم در ریشه‌هایی که دچار آکسوتومی شده‌اند توانسته است از آپوپتوز ناشی از قطع ارتباط آکسونی جلوگیری نماید و هم در ریشه‌های سمت سالم از آپوپتوز خودبه‌خودی بعد از تولد جلوگیری نماید.

نقش حفاظتی دپرنیل در سیستم اعصاب مرکزی (CNS) و اعصاب حرکتی توسط محققین زیادی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱، ۱۲، ۱۳، ۱۸). پژوهش حاضر اثرات ضد آپوپتوز دپرنیل را بر روی نورونهای حسی ریشه‌های پشتی نخاع که بخشی از دستگاه اعصاب محیطی (Peripheral Nervous System) می‌باشد به نمایش گذاشته، در مجموع نشان می‌دهد که دپرنیل با مکانیسم‌های مشترکی هم در CNS و هم در PNS از ورود نورونها به فاز مرگ سلولی و آپوپتوز جلوگیری می‌کند.

تشکر و قدردانی

از همکاران محترم، آقای دکتر دلشاد عضو هیئت علمی دانشگاه شاهد، آقای کهربا و آقای بیرانوند کارشناسان آزمایشگاههای پاتولوژی و



حضور اجسام آپوپتوتیک (Apoptotic body) که نشان دهنده بقایای سلولهای یاد شده است، بوضوح دیده می‌شد (تصویر ۲).

بحث

بررسی نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از این می‌باشد که عمل آکسوتومی باعث کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) در تعداد نورونهای گانگلیون‌های ریشه پشتی مربوطه شده و این کاهش بر اثر آپوپتوز به وقوع پیوسته است. در گروههای آزمایشی، تیمار با دپرنیل موجبات جلوگیری از آپوپتوز و کاهش نورونها را فراهم نموده، در مجموع باعث افزایش آنها شده است. به طوری که از نتایج جدول ۱ مشخص می‌گردد در عقده‌های سمت آکسوتومی شده گروه کنترل، ۴۸ درصد نورونها نسبت به نورونهای سمت راست خود کاهش نشان می‌دهند. به عبارت دیگر ۴۸ درصد نورون‌ها در اثر آکسوتومی از بین رفته‌اند. این در حالی است که در عقده‌های گروههای آزمایشی این کاهش بالنسبه کمتر بوده و مخصوصاً در گروه ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم به کمترین میزان یعنی به ۱۹ درصد رسیده و این نتیجه، در مقایسه سایر گروهها معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در ضمن در گروه ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بر خلاف روند مورد انتظار، یک آشفستگی در نتایج دیده می‌شود که در نتایج هر سه جدول مشهود بوده و با توجه به اینکه Panahi و Taki در سال ۲۰۰۲ همین آشفستگی را در دوز ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به بالای دپرنیل مشاهده نموده و آنرا به دوز سمیت دارو نسبت داده‌اند (۱۲)، احتمالاً این آشفستگی نیز به همان دلیل می‌باشد.

نتایج جدول ۲ تاثیر دپرنیل را در جلوگیری از آپوپتوز به صورتی دیگر توضیح می‌دهد؛ چنانچه مشاهده می‌گردد مقایسه میانگین درصد نورونهای ریشه پشتی نخاع سمت چپ گروههای مورد آزمایش (AxL) با میزان نورونهای همان سمت در گروه کنترل (AxLc) نشان می‌دهد که با افزایش دوز دارو در صد نورونهای گروههای آزمایشی نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرده است؛ به طوری که نورونهای سمت چپ گروه ۰.۱ میلی‌گرم در کیلوگرم، به میزان ۶۹ درصد نسبت به عقده مشابه گروه کنترل افزایش را نشان می‌دهد. رقم مذکور برای گروههای بعدی بترتیب افزایش مقدار داروی تجویز شده، ۷۵ درصد، ۸۰ درصد، ۱۴۸ درصد و ۵۹ درصد می‌باشد. چنانچه مشخص است بیشترین افزایش (۱۴۸ درصد) متعلق به گروه ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم بوده است و این نتیجه با گزارش Paterson و همکاران در سال ۱۹۹۸ که با مقدار ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم دپرنیل بهترین نتایج حفاظتی نورونها را گزارش کرده است (۱۳) مطابقت دارد.

مقایسه میانگین درصد نورونهای سمت آکسوتومی نشده (راست) گروههای مورد آزمایش (NaxR) که صرفاً از دارو تاثیر پذیرفته‌اند با نورونهای گانگلیون سمت راست گروه کنترل (NaxRc) که از هیچ‌گونه تأثیر دارویی و جراحی متأثر نبوده‌اند (جدول ۳)، نشان می‌دهد که متناسب با افزایش دوز دپرنیل، نسبت مذکور افزایش پیدا کرده است. این نسبت در گروه ۰.۱ میلی‌گرم در کیلوگرم به ۳۰ درصد و در گروههای بعدی به ترتیب به

جدول ۳- نمایش میانگین (درصد) افزایش نورون‌های سمت راست آکسوتومی نشده گروههای آزمایشی (NaxR) نسبت به نورونهای آکسوتومی نشده همان سمت گروه کنترل (NaxRc). میانگین تعداد نورونهای سمت راست گروه کنترل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده است.

گروهها (میلیگرم در کیلوگرم)	Mean ± SEM	درصد افزایش نورون‌های NaxR نسبت به NaxRc
۰/۱	۳۰ ± ۳/۸	
۱	۳۷ ± ۶/۹	
۱۰	۴۰ ± ۲/۱	
۲۵	۶۰ ± ۹/۶	
۵۰	۴۳ ± ۸/۸	

* = $P < 0.05$

میانگین تعداد نورونهای شمارش شده در گانگلیون‌های (سمت راست و چپ) گروه شاهد و نیز میانگین تعداد نورونهای شمارش شده در عقده‌های سمت آکسوتومی نشده (راست) گروههای آزمایشی به عنوان مینا و ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شدند. آنگاه میانگین تعداد نورونهای شمارش شده عقده‌های آکسوتومی شده (سمت چپ) هر یک از گروههای آزمایشی به عنوان در صدی از نورون‌های مینا، محاسبه گردیدند. برای مقایسه میانگین درصد نورونهای سمت راست و چپ در هر گروه و آنالیز آماری آنها از آزمون تی و برای مقایسه نورونهای گروههای آزمایشی با گروه کنترل از آنالیز یکطرفه واریانس و در ادامه آن از آزمون Dunnet استفاده گردید.

نتایج

مقایسه تعداد نورونهای گانگلیون سمت چپ آکسوتومی شده (AxL) با نورونهای سمت راست آکسوتومی نشده (NaxR) در هر یک از گروههای مورد آزمایش (از ۰/۱ الی ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) نشان داد که عمل آکسوتومی باعث کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) در تعداد نورونها و به عبارت دیگر کاهش در صد آنها در گروههای آزمایشی شده است. این کاهش بترتیب ۳۲ درصد، ۳۱ درصد، ۳۳ درصد، ۱۹ درصد و ۴۸ درصد بود (جدول ۱). همچنین مشخص گردید که نورونهای عقده سمت چپ هر یک از گروههای آزمایشی نسبت به نورونهای همان سمت گروه کنترل (AxL/AxL) بترتیب به میزان ۶۹ درصد، ۷۵ درصد، ۸۰ درصد، ۱۴۸ درصد و ۵۹ درصد افزایش پیدا کرده است ($P < 0.05$) (جدول ۲). مقایسه تعداد نورونهای سمت (راست) گروههای مورد آزمایش با تعداد نورونهای همان سمت گروه کنترل (NaxR/NaxRc) نشان داد که میانگین نورونهای سمت راست گروههای پنجگانه مورد آزمایش بترتیب ۳۰ درصد، ۳۷ درصد، ۴۰ درصد و ۴۳ درصد افزایش پیدا کرده است ($P < 0.05$) (جدول ۳).

مشاهدات ریزبینی مقاطع نورون‌های آکسوتومی شده وقوع آپوپتوز را تایید می‌نمود. در نورونهای مذکور، غلایم میکروسکوپی آپوپتوز شامل چروکیده شدن نورونها، تجمع کروماتین در زیر غشا هسته و یا فشرده شدن آن در یک سمت هسته و تشکیل هلال کروماتینی (Nuclear Cap) و نیز



8. Matsubara, k., Senda, T., Uezono, T., Awaya, T., Ogawa, S., Chiba, k., Shimizu, K., Hayase, N., Kimura, K(2001): L-Deprenyl Prevents the cell hypoxia induced by dopaminergic neurotoxins, MPP(+) and beta - Carbolinium: a microdialysis study in rats. *Neurosci lett*; 302(2-3):65-8.
9. Mohamed Hadi, Bahadori; Taki, AL - Tiraihi, Mujtaba Rezazadeh(2001): Sciatic nerve Transection in neonatal rats induces apoptotic neuronal death in L5 dorsal root ganglion. *Journal of Neurocytology*; 30:125-130.
10. Naoi, M., Maruyama, W., Takahashi, T., Akao, y., Nakagawa, y(2000): Involvement of endogenous N-methyl(R) Salsolinol in Parkinson's disease: induction of apoptosis and protection by (-)deprenyl. *J Neural Transm suppl*; 58:111-21.
11. Oliveira, Al., Risling, M., Negro, A., Langone, f., Cullheims'(2002): Apoptosis of Spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. *J, Comp, Neurol*; 447(4):381-93.
12. Panahi, M., Al-Tiraihi, T.(2002): Morphometric evaluation of the Neuroprotective effect of deprenyl on postaxotomic motor neuron losses. *Clin Neuropharmacol*; 25(2):75-8.
13. Paterson, IA., Zhang, D., Warrington, RC., Boulton, AA.(1998): R-deprenyl and R-2-heptyl-N-methyl propargylamine prevent apoptosis in cerebellar granule neurons induced by cytosine arabinoside but not low extracellular potassium. *J, Neuro Chem*; 70(2):515-23.
14. Red Show, JD., Bisby, MA (1985): Comparison of the effects of sciatic nerve crush or resection on the proteins of fast axonal transport in rat. *EXP Neurol*; 88(2): 437-46.
15. Shah, KA., Shurey, S., Green, CJ.(19997): characterization of apoptosis in intestinal ischemia-reperfusion injury- a light and electron microscropy study. *Int Exp Pathol*; 78(5): 355-63.
16. Shen. H., Chung, JM., Coggeshall, RE., Chung, k., (1999): Changes in trkA expression in the dorsal root ganglion after peripheral nerve inyury. *EXP Brain Res*; 127(2):141-6.
17. Sugimoto, T., Xiao, C., Ichikawa, H.(1998): Postnatal changes in Bax- immunoreactivity and apoptosis of the trigeminal primary neurons. *Neurosci Lett*; 258:97-100.
18. Tatton, WG., Wadia. JS., Ju, wy., Chalmers - Redman, RM., Tatton, NA. (1996): (-)- Deprenyl reduces neuronal apoptosis and facilitates neronal outgrowth by altering protein syntheses without inhibiting Monoamine oxidase. *Neural Transm Suppl*; 48:45-59.
19. Unal, I., Gursoy- Ozdemir, Y., Bolay, H., Soylemezoglu, f., Saribas, O., Dalkarat (2001): Chronic daily administration of selegiline and EGb 761 increases brain's resistance to ischemia in mice. *Brain Res*; 917(2):174-81.
20. Wu, RM., Mohanakumar, KP., Murphy, DL., Chiueh, CC. (1994): Antioxidant mechanism and Protection of nigral neurons against MPP(+) toxicity by deprenyl(Selegiline). *Ann NY Acad Sci* ; 738:214-21.



